

30H6F (= 30H6A1D22)'

OCTR, FAM.

Bruxelles, le 28 Février 1967.

SECTION

Américain d'Amérique  
de Jool WARREN,

tions de l'homme ou des animaux, telles que la grippe, la maladie des chiens ou la peste porcine.

Dans le présent mémoire, le terme "virus" englobe tous les virus qui sont vivants aussi bien qu'inactivés, c'est-à-dire, virus morts ou atténués. La présente invention est largement applicable à des virus du type antigène qui sont susceptibles de provoquer des maladies infectieuses chez l'homme et chez les animaux. Certains des nombreux virus de ce type qui peuvent être soumis au procédé de la présente invention sont: la rage, la parotidite épidermique, la grippe, le parainfluenza, la variole vaccinique, l'encéphalomyélite équine, la maladie des chiens, la poliomyélite, l'encéphalomyocardite, la peste porcine, l'encéphalite de St Louis, la fièvre jaune, l'adénovirus, la rougeole, le coxackie, l' ECHO et les virus froids communs.

Le terme milieu aqueux vise n'importe quel système de culture approprié bien connu des spécialistes. Par exemple, les milieux aqueux suivants illustrent des systèmes de culture appropriés: les tissus cellulaires avien, simien et humain ou les cultures de tissus; et les cultures de bouillons nutritifs.

Le procédé de préparation du composé intermédiaire précieux oxyde de fer magnétique - virus vaccin de la présente invention peut être effectué de deux façons:

a. on cultive un virus dans un milieu nutritif aqueux ou dans une culture de tissus en présence d'oxyde de fer magnétique en particules ou

La présente invention a pour objet générale la production de vaccins et, en particulier, l'invention concerne la concentration et la purification des virus biologiques et de leurs fractions solubles de ces vaccins.

Le procédé global de la présente invention consiste à mettre en suspension dans un milieu aqueux un complexe magnétique de particules d'oxyde de fer-virus vaccinal. À dissocier le complexe par l'application d'un champ magnétique et à récupérer le virus libéré.

Le nouveau procédé présente les avantages suivants :  
 1. - une phase de purification ;  
 2. - un procédé de concentration ;  
 3. - une forte efficacité de séparation.

Par ailleurs, la présente invention concerne la production d'un complexe d'oxyde de fer magnétique-virus vaccinal. Le procédé de la présente invention est basé sur le fait que le virus vaccinal se lie à l'oxyde de fer magnétique en solution aqueuse. Un tel produit peut être utilisé pour la purification et la concentration des virus biologiques, pour la production de vaccins.

b. on développe d'abord ce virus dans un milieu aqueux, on l'inactive, si on le désire, et on ajoute ensuite de l'oxyde de fer magnétique sous forme d'une poudre ou d'une suspension.

Si le processus a. est suivi, il ne semble pas y avoir d'effet adverse sur les cultures de tissus et l'oxyde de fer utilisé semble être inoffensif pour les cellules qui continuent à se multiplier de façon normale. Par exemple, des concentrations d'oxyde de fer comprises entre 0,1 mg environ et 0,5 mg environ/ml dans des cultures fibroplastes d'embryons de poulet semblent avoir peu ou pas de toxicité vis-à-vis des cellules et la croissance continue en présence de l'oxyde de fer pendant au moins 1 semaine. Des oeufs de poule embryonnés vieux de 9 jours auxquels on a inoculé 10 mg de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  dans l'espace chorioallantoïque se développent normalement pendant au moins 3 jours.

On ne sait pas exactement si le complexe oxyde de fer-vaccin qui se forme est un simple mélange physique ou s'il se produit une véritable liaison chimique. Cependant, comme l'adsorption présente est favorisée par des températures élevées, cela indique qu'il se peut qu'il se soit formé une véritable liaison chimique. Dans le cas du virus de la grippe, on a constaté que l'adsorption augmente rapidement jusqu'à une efficacité maximale d'environ 10 mg/ml de fer à température ambiante en secouant pendant 30 minutes. On a constaté en outre que cette adsorption est relativement peu influencée par les variations du pH de

l'ordre de 6-9.

En ce qui concerne l'oxyde de fer magnétique en particules, il peut être de forme cubique ou aciculaire. On a constaté que plus le calibre particulaire est petit, et plus l'adsorption de virus de la suspension est efficace. N'importe quel traitement qui rend les particules plus poreuses et augmente leur surface, par exemple un traitement antérieur à l'aide de HCl dilué, confère une amélioration à l'efficacité de l'adsorption. Les meilleurs résultats, cependant, sont donnés par un oxyde de fer magnétique qui a été broyé jusqu'à obtenir une fine poudre par un procédé de broyage dans un broyeur à boulets. Une suspension aqueuse de cet oxyde de fer magnétique peut être stérilisée dans un autoclave à une pression de vapeur de 1,06-1,40 kg/cm<sup>2</sup> pendant 20 minutes.

Dans les buts recherchés par la présente invention, lorsqu'on utilise le terme "oxyde de fer", on vise le composé gamma  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Bien que l'oxyde de fer magnétique ayant la formule  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  soit de loin préféré, il est possible - et cette utilisation est comprise dans la présente invention - d'utiliser n'importe quelle forme d'oxyde de fer qui soit de nature magnétique; par exemple, on peut substituer à l'oxyde gamma  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , de façon efficace, du  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , du  $\text{FeO}$  ou n'importe quelle combinaison possible de ces deux oxydes.

Les complexes oxyde de fer-virus vaccin de la présente invention peuvent être enlevés de façon efficace de la solution par l'application d'un champ

magnétique ou par centrifugation à vitesse peu élevée. L'enlèvement à écoulement continu et la capture des complexes d'oxyde de fer peuvent être réalisés en faisant descendre les matières à l'aide d'un aimant. Le complexe oxyde de fer-virus vaccin obtenu est tout à fait stable et n'est pas affecté par des substances tampon de type borate ou citrate ou par les tampons organiques en général. Par exemple, le virus ne peut être enlevé des complexes de fer par le citrate, le formiate, le borate ou le glutamate de sodium. En outre, la liaison résiste à une variété d'agents tensio-actifs et de solvants.

Cependant, on a constaté qu'une dissociation efficace des complexes oxyde de fer - vaccin et une récupération des virus adsorbés pouvaient être réalisées par traitement à l'aide d'une solution aqueuse saturée d'un sel de sodium d'un acide choisi parmi l'acide phosphorique et l'acide carbonique. Les agents de dissociation particulièrement efficaces sont les solutions saturées de phosphate de sodium ou de bicarbonate de sodium, qui donnent pour résultat la libération des virus qui peuvent être ensuite isolés après élimination de l'oxyde de fer par un aimant ou par centrifugation.

Les exemples suivants illustrent les composés de la présente invention. Ils sont donnés à titre illustratif mais non limitatif.

EXEMPLE I.

Le tableau suivant illustre l'efficacité de l'oxyde de fer magnétique pour déplacer six virus de la grippe différents d'une suspension dans un fluide allantoïque infecté:

<u>Souche</u>	<u>Concentration du virus au départ</u>	<u>Concentration du virus restant dans le milieu surnageant après l'adsorption</u>
PR-8	960 *	40
B/lee	512	256
B/England	128	8
Swine	256	4
Jap 305	256	4
Ann Arbor	128	1

\* unités d'hémagglutination/ml.

Toutes les souches se trouvent dans des fluides allantoïques d'œufs fraîchement récoltés et non traités. Après mélange de chaque virus et de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , à une concentration de 20 mg/ml, l'adsorption est effectuée à température ambiante dans un secoueur orbital pendant 30 minutes. A la fin de cette période, le complexe oxyde de fer - virus est attiré vers la base du réceptacle de verre par un aimant de forte puissance et le fluide clair surnageant est enlevé et testé pour déceler son aptitude à hémagglutiner des érythrocytes de poulet, cela constituant une indication sensible de la présence de virus de la grippe résiduel. . Le tableau donné ci-dessus montre qu'une activité du virus considérable est éliminée du



fluide surnageant après déplacement du complexe oxyde de fer - virus de la solution.

EXEMPLE II.

D'une manière similaire au processus indiqué dans l'exemple I, on réalise un complexe d'un virus de la poliomyélite, de type Sabin II, avec de l'oxyde de fer, et on obtient des résultats comparables.

EXEMPLE III.

Le tableau ci-dessous montre l'interdépendance de la concentration de l'oxyde de fer et de l'adsorption du virus de la grippe, la souche BR-8. Dans cet exemple, le virus adsorbé est ensuite élué du  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  à l'aide de phosphate de sodium dibasique à 10 %.

Détermination de la quantité optimale de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  pour l'adsorption du virus.

Oxyde de fer mg/ml	Conc. du virus dans le milieu d'adsorption qui surnage	Conc. du virus dans l'éluat
0	960 *	-
1,0	640	480
2,5	480	640
5,0	160	640
7,5	120	960
10	40	960
15	20	960
20	4	960
40	2	640

\* HA/1,0 ml.

On a ajouté à un fluide allantoïque d'oeuf infecté des quantités appropriées d'oxyde de fer. Les mélanges ont ensuite été secoués en 30 minutes à température ambiante, après quoi les complexes oxyde de fer-virus ont été enlevés à l'aide d'un aimant et les liquides surnageants mis au rebut. Le sédiment a ensuite été élué à l'aide de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  à 10 % en secouant pendant 10 minutes, l'oxyde de fer a été à nouveau enlevé et le fluide surnageant titré pour déceler sa teneur en virus résiduel.

Cela montre clairement que l'adsorption augmente rapidement jusqu'à une efficacité maximale d'environ 10  $\text{mg/ml}$  et que toute l'activité initiale est récupérée dans l'éluat issu du complexe  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -virus traité à l'aide de phosphate.

#### EXEMPLE IV.

Le tableau ci-dessous montre la dissociation efficace d'un virus de la grippe PR-8 du complexe d'oxyde de fer correspondant:

<u>Elution avec 10 % <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math></u>	<u>Concentration du virus</u>
initiale	960 *
solution saline physiologique de lavage de $\text{Fe}_2\text{O}_3$ + virus	30
extraits conc. 5 X dans $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	3840
<u>Elution avec 9 % <math>\text{NaHCO}_3</math> (saturé)</u>	
initiale	960
milieu d'adsorption surnageant	30
solution saline physiologique de lavage de $\text{Fe}_2\text{O}_3$ + virus	40
extraits conc. 5 X dans $\text{NaHCO}_3$	5180
* HA/1,0 ml.	

La souche PR-3 de la grippe est adsorbée à partir de fluide allantoïquedeuf à l'aide de 20 mg/ml de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  en secouant à la température ambiante pendant 20 minutes. Le complexe d'oxyde de fer-virus est ensuite enlevé à l'aide de l'aimant et les fluides surnageants titrés, puis mis au rebut. Le sédiment est remis en suspension dans une solution de chlorure de sodium physiologique pour le laver, ensuite il est magnétiquement récupéré et les fluides de lavage mis au rebut. Le sédiment constitué d'oxyde de fer et de virus adsorbé est ensuite remis en suspension dans un cinquième de volume du fluide initial du sel de sodium indiqué ci-dessus pour dissocier le virus, et ce sédiment est ensuite titré pour déceler sa teneur en hémagglutinine.

EXEMPLE V.

Le tableau ci-dessous donne les réponses en anticorps chez des cobayes qui ont été vaccinés à l'aide d'une seule dose d'un vaccin de la grippe inactivée polyvalent de 5 souches, les constituants de ce vaccin étant concentrés par adsorption sur de l'oxyde de fer et ensuite élués pour donner un concentrat, comme dans l'exemple IV.

Concentration de 5 antigènes de grippe sur un milieu  
ferrique et réponse en anticorps chez des cobayes vaccinés  
Titres de virus pendant le  
traitement par le vaccin:

I.	Matière	Souches de virus				
		AA	PR-8	Jap 170	B/Md.	B/Lec
	fluide récolté dans les oeufs	640 *	2560	160	80	320
	vaccin monovalent (orig.)	640	2560	160	80	320
	milieu surnageant issu de l'adsorb. par $Fe_2O_3$	128	128	4	4	64
	milieu surnageant concentré 10 X	5120	32000	640	640	2560
	véritable concentration basée sur HA	8X	12,5X	4X	8X	8X

\* Unités HA/0,5 ml

II.

Vaccin injecté par voie intramusculaire 0,5 ml

original	128 *	512	32	16	64
liquide surnageant issu de $Fe_2O_3$	25	25	1	1	13
concentré 10X	1024	6400	128	128	512

\* unités HA/0,5 ml

III.

Souches de virus

Matière	AA	PR-8	Jap 170	B/Md.	B/Lec
titres d'anticorps des sérums de cobayes vaccination après 3 semaines avec les 5 vaccins montrés					
original	10 *	40	320	10	10
milieu surnageant polyvalent conc.	10	20	20	20	10
milieu surnageant polyvalent conc. 10X	40	80	80	10	10

milieu surnageant polyvalent conc.	10	10	20	10	10
milieu surnageant polyvalent conc 10X	80	80	80	20	20

\* titre HAI - inverse de la dilution du sérum

#### IV.

moyenne géométrique des titres des sérums individuels

15 animaux - original	3,2	8,2	5,0	2,5	1,8
15 animaux - milieu surnageant	2,1	3,9	1,8	3,1	1,4
11 animaux - milieu surnageant concentré 10 X	26,3	42,6	15,2	13,7	6,7

#### V.

Concentration en protéines ugm/ml

originale	1125	760	1900	310	360
milieu surnageant monovalent	375	300	450	105	150
10 X	1325	480	1040	300	575

#### VI.

concentration totale d'azote ugm/ml

originale	654,3	609	693	610	620
milieu surnageant	551	622	594	620	575
10 X	109	58	81	24	44

#### VII.

analyse du fer - restant dans le vaccin - ugm/ml

original	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
10 X	< 0,2	< 0,2	< 0,2	0,8	2,0

Les résultats montrés indiquent qu'il est possible de concentrer et de purifier des antigènes de virus de la grippe par ce procédé et de produire des taux d'anticorps améliorés chez un hôte vacciné.

EXEMPLE VI.

Le vaccin biologique préparé par le procédé décrit dans l'exemple 4 susmentionné retient sa stabilité antigène pendant des périodes de temps prolongées, comme montré dans l'exemple suivant:

Rétention des titres HA dans les virus de la grippe concentrés 10 X par le processus d'adsorption à l'oxyde ferrugineux et stockés à 5°C pendant 56 jours.

	AA	PR-8	Jan 170	B/Md.	B/Lee
Initiale	5120	32 000	640	640	2650
après stockage	5120	10 000	640	1280	5120

EXEMPLE VII.

Le processus de l'exemple I est répété, dans lequel les souches de grippe montrés sont développés dans le fluide allantoïque de l'oeuf simultanément en présence de l'oxyde de fer en particules. On obtient à peu près les mêmes résultats, ce qui indique qu'il n'y a pas d'effets latéraux résultant de la présence de l'oxyde de fer pendant la phase de la culture. Expérimentalement, une suspension de l'oxyde de fer est inoculée avec le virus dans les oeufs. Des témoins sont également préparés qui contiennent le virus seul. Les oeufs obtenus sont incubés pendant 48 heures à 35°C, après quoi la teneur en virus du fluide allantoïque dans les oeufs traités et dans les oeufs non traités servant de témoins est déterminée. Par comparaison, on se rend compte que les résultats sont sensiblement équivalents.

REVENDEICATIONS.

1.-.Procédé amélioré pour concentrer et purifier des vaccins biologiques, caractérisé en ce qu'on met en contact un virus mis en suspension dans un milieu aqueux avec un oxyde de fer magnétique particulière et en ce qu'on sépare le complexe oxyde de fer - virus vaccin obtenu de ce milieu.

2.- Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la séparation précitée est effectuée en appliquant un champ magnétique.

3.- Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le virus est un virus de la grippe pe.

4.- Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le virus est un virus de la poliomyélite.

5.- Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le virus est cultivé dans un milieu aqueux en présence de l'oxyde de fer particulière.

6.- Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le complexe oxyde de fer-virus vaccín est traité à l'aide d'une solution aqueuse saturée d'un sel de sodium d'un acide choisi parmi l'acide phosphorique et l'acide carbonique et en ce que le virus ainsi dissocié est récupéré.

7.- Composition de vaccin magnétiquement susceptible, caractérisé en ce qu'elle comprend un oxyde de fer magnétique en particules qui forme un complexe avec un virus.